

ヒト前立腺癌の転移実験モデルとしての受精鶏卵法の有用性

金沢大学医学部医学科泌尿器科学講座 (主任: 並木幹夫教授)

小林 忠 博

前立腺癌の転移形成における特徴的な所見として骨転移の頻度が高いことがあげられ、骨転移の有無は前立腺癌の予後を規定する重要な因子である。前立腺癌の予後を改善するためには骨転移の克服が最も重要な課題であり、そのためには再現性の高い前立腺癌の骨転移モデルの樹立が必要不可欠と考えられる。本研究ではヒト前立腺癌の転移実験モデルとして受精鶏卵法を応用し、その有用性について考察した。さらに、本法を用いて PC-3 細胞の転移に対するスラミンの抑制効果について検討を行った。孵卵10日目の受精鶏卵漿尿膜上の血管内より、 1×10^6 個の PC-3 細胞を移植し、経時的に肝および大腿骨を摘出した。転移細胞の検出ならびに定量は、各臓器より抽出した DNA を鋳型として、ヒト β -グロビン遺伝子に対する PCR 法による増幅反応とそれに次ぐサザンブロット法による増幅 DNA 断片の解析 (PCR-サザンブロット法) により行った。その結果、PC-3 細胞は肝および骨転移を100%形成することが明らかになった。さらに PCR-サザンブロット法により、転移細胞の定量的解析も可能であった。すなわち、臓器あたりの転移腫瘍細胞数は移植後経時的に増加し、移植後7日目の肝では約 9.1×10^6 個、また大腿骨では約 9.9×10^6 個の転移細胞が検出された。組織学的検索の結果、移植2時間後の肝において微小血管内に存在していた PC-3 細胞は、1日目では血管外へ浸潤し、3日目以降、肝実質において分裂増殖像を示しつつ転移巣を形成した。一方、大腿骨においては、形態学的に腫瘍細胞の同定は困難であったが、抗ヒトサイトケラチン抗体および抗ヒト Ki-67 抗原抗体による免疫組織化学染色により、7日目で初めて骨髓内および骨膜内に転移巣の形成が確認された。続いて、本法を用いて PC-3 細胞の肝転移巣および骨転移巣に対するスラミンの抗腫瘍効果について検討した。PC-3 細胞を漿尿膜上の血管に移植後1日目または3日目にスラミンを投与し、7日目に肝および大腿骨を摘出して、PCR-サザンブロット法による転移細胞の検出および解析を行った。その結果、PC-3 細胞移植後1日目にスラミン ($50 \mu\text{g}/\text{卵}$) を投与した場合は、明らかな転移抑制効果は認められなかった。一方、移植後3日目にスラミン ($500 \mu\text{g}/\text{卵}$) を投与した場合、肝転移巣に対しては60.6%の増殖抑制率を示したが、骨転移に対しては6.7%と抗腫瘍効果は認められなかった。以上の結果より、受精鶏卵法は再現性の高いヒト前立腺癌細胞の骨および肝への転移実験モデルとして、ヒト前立腺癌の転移あるいは浸潤の機序解明および治療薬開発の基礎的研究に有用な実験系になりうるものと考えられた。

Key words prostate cancer, metastasis, chick embryo, PC-3, suramin

高齢化と生活様式の欧米化によって、我が国の前立腺癌の罹患率および死亡数は増加傾向にある¹⁾。これまで前立腺癌の過半数の症例は初診時既に遠隔転移を有し²⁾根治的治療は困難であった。しかし、経直腸的超音波断層法および腫瘍マーカーとしての前立腺特異抗原 (prostate specific antigen, PSA) の臨床応用が進むにつれて、前立腺癌の早期診断が可能になりつつある³⁾。最近では逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法による腫瘍細胞の PSA mRNA の検出が可能となり、従来の診断法では検出不可能であった微小転移の存在が明らかとなってきた⁴⁾。これらの微小転移に対する治療手段の開発は前立腺癌の根治的治療に必須である。そして、微小転移に対する抗腫瘍効果を評価するためにはヒト前立腺癌転移を効率よく再現できる転移実験モデルを樹立する必要がある。これまで、ヒト前立腺癌の転移実験モデルとしては、ヌードマウス⁵⁻⁷⁾や SCID マウス⁸⁾を用いた方法が報告されてきた。しかし、実験動物のコスト、特殊な動物実験施設の必要性、転移形成率の再現性に問題を残しており、治療実験モデルとし

て一般的に応用されるに至っていない。受精鶏卵法は、ヒト腫瘍を含め実験動物腫瘍を宿主動物に移植する方法として、手技の簡便さ、移植腫瘍の生着率が高いという点で優れている¹⁰⁻¹⁴⁾。さらに、短期間で効率的にしかも安価に転移実験が可能であることに加え、PCR 法を応用することにより定量的に転移細胞の検出が可能である¹⁵⁾ことから、特に治療薬開発のためのスクリーニング法としての応用が期待される。本研究では、受精鶏卵法を応用したヒト前立腺癌の転移実験モデルについて検討するとともに、その応用として本実験系を用い、現在ホルモン抵抗性前立腺癌転移患者の治療薬として注目されているスラミン¹⁶⁻¹⁸⁾の抗腫瘍効果について検討を行い、治療薬の効果判定法としての有用性について考察した。

材料および方法

I. 実験腫瘍細胞および培養法

ヒト前立腺癌培養細胞 PC-3¹⁹⁾ [American Type Culture Collection, Rockville, USA] は、10% (v/v) 非働化ウシ胎児血

平成8年11月18日受付, 平成8年12月19日受理

Abbreviations: bp, base pair; EPOS, enhanced polymer one-step staining; IR, inhibition rate; MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; PSA, prostate specific antigen; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TE, Tris-EDTA

清(fetal calf serum, FCS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) と 0.3mg/ml グルタミン (日水製薬, 東京) を含むRPMI-1640培地 (日水製薬) 中において, 5% CO₂ 濃度, 37℃で培養した。

II. 実験動物

本研究で培養細胞の移植宿主動物として用いた受精鶏卵 (ブリマスロック種×ホワイトレグホン種) は後藤鶏卵場 (岐阜) より購入し, 加湿した37℃孵卵器中で孵卵した。

III. 培養細胞の移植方法

受精鶏卵への PC-3 細胞の移植は Uchida ら¹⁴⁾の方法に準じて行った。すなわち, 孵卵10日目の鶏卵を透光し, 漿尿膜上の血管の位置を定め, 回転式のヤスリを用いて卵殻に 1cm×0.5cm 程度の傷を付け, ピンセットを用いて卵殻を除去した。露出した卵殻膜に流動パラフィン (Merck, Darmstadt, Germany) を滴下し血管を見やすくし, 30ゲージ針を用いて 1×10⁷個/ml に調製した PC-3 細胞浮遊液, 0.1ml (10⁶個/卵) を漿尿膜上の血管内に移植した。移植後 1, 3, 5 および 7 日目に胎児を屠殺し, 肝および左右の大腿骨を摘出し以下の検討に用いた。また同一個体の肝の一部および対側の大腿骨を10%ホルマリンにて固定後, HE 染色にて標本作製し, 肝転移, 骨転移の有無を病理組織学的に検索した。

IV. 免疫組織化学染色

転移巣がヒト由来であることを証明するため, ヒト特異抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。免疫染色には, 増幅ポリマー段階染色 (enhanced polymer one-step staining, EPOS) 法²⁰⁾にて行い, ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ヒトサイトケラチン抗体 (MNF116, EPOS/HRP, DAKO, Glostrup, Denmark), 抗ヒト Ki-67 抗原抗体 (EPOS/HRP, DAKO) を使用した。すなわち, 10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィン, 親水化した後, サイトケラチンに対する免疫染色にはプロテインナーゼ K (DAKO) で室温 6 分間酵素処理し, また, Ki-67 抗原に対する免疫染色には, 10mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に切片を浸しマイクロウェーブ処理を 5 分間行った。3%過酸化水素水にて10分間, 内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後, 非特異的反応を阻止するため3%ウシ血清アルブミン (DAKO) を 5 分間反応させた。ついで, 抗ヒトサイトケラチン抗体を室温60分間反応させた。また, 抗ヒト Ki-67 抗原抗体は, 4℃で一晩反応させた。一次抗体の反応終了後, 0.1%の過酸化水素水を含有した 3, 3' ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine, DAB, DAKO) を滴下して室温 10 分発色反応を行った。さらに核染色をヘマトキシリンにより行った。

V. DNA 抽出

摘出臓器の DNA は DNAzol (GIBCO) を用いて抽出, 精製した。すなわち, 摘出した肝に 1ml の Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (ニッポンジーン, 東京) を加えガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズし, そのホモジネート 100μl に対して 1ml の DNAzol を加え懸濁させた。また, 大腿骨は 1ml の DNAzol を加えホモジナイズした後, 4℃, 15,000rpm, 15分間遠心した。上層を新しいチューブに移し, 0.5ml の 99%エタノールを加え混合し, 室温下 5 分間放置した後, 液中に浮遊する DNA を得た。DNA を新しいチューブに移し, 1ml の 95%エタノールを加え 2 回洗浄し, 風乾した後 8mM 水酸化ナトリウム水溶液を加え溶解させた。さらに, 0.1M HEPES (Sigma, St. Louis, USA) を加え, pH を 7.5 に調整した。

VI. 鋳型 DNA の調整

各 DNA の 260nm における OD 値を測定して DNA 濃度 (1 OD=50μg/ml) を求めた後, 滅菌蒸留水を用いて 100μg/ml に調製した。さらに, 100μg/ml の PC-3 細胞の DNA を滅菌蒸留水により希釈し, PC-3 細胞の DNA 濃度が 10², 10, 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³μg/ml の段階希釈溶液を調製した。

VII. PCR プライマーおよびプローブ用オリゴヌクレオチドの合成

PCR プライマーとプローブ用オリゴヌクレオチドは太田²¹⁾の報告に準じ, ヒト β-グロビン遺伝子 183塩基対を特異的に増幅する Hu β-1: 5'-AGAGCCATCTATTGCTTACA-3' と Hu β-5: 5'-CTGTCTTGTAAACCTTGATAC-3', およびプローブ用オリゴヌクレオチド, Hu β-3: 5'-GAAGTCTGCCGTTACTGCCC-3', を DNA 合成装置 PCR メイト (Applied Biosystems, Foster, USA) により合成した (表 1)。プローブ DNA 13 pmol に対し [γ-³²P] ATP 50μCi (Amersham, Greenwhich, USA), ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH 7.6), 10mM 塩化マグネシウム, 5mM ジチオトレイトール, 0.1mM スペルミジンおよび 0.1mM EDTA (pH 8.0)], 10単位 T4 キナーゼ (宝酒造, 京都) および滅菌蒸留水を加え全量 20μl とし, 37℃において 45 分間反応させた後ハイブリダイゼーションに用いた。

VIII. PCR 反応およびサザンブロットハイブリダイゼーション法 (PCR-サザンブロット法) による増幅 DNA 断片の検出

Endo ら¹⁵⁾が報告した方法に従い, 鶏卵胎児肝および大腿骨から抽出調整した DNA に対してヒト β-グロビン遺伝子の PCR による増幅反応を行った。調製した鋳型 DNA 1μg に対して PCR 反応緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム], デオキシリボヌクレオチド混合液 (dATP, dGTP, dCTP および dTTP 各 200μM), Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造) 2.5単位, 各々 1μM のプライマーを加え, 滅菌蒸留水により全量 100μl に調整した。反応には DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus) を使用し, 熱変性を 94℃, 1 分間, アニールを 55℃, 2 分間, DNA の伸長を 72℃, 1 分間とし, これを 1 サイクルとして, 28 サイクル繰り返した。増幅後の DNA 溶液に 10μl の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) および 300μl のエタノールを加え, 4℃, 15,000 rpm にて 20 分間遠心し DNA を沈殿させた。DNA は, 80%エタノール 300μl にて洗浄した後, 減圧乾燥し, 試料溶解液 (0.06%ブロムフェノールブルー, 0.06%キシレンシアノールおよび 6.7%グリセロールを含む TE 緩衝液) 9μl に溶解した。各試料を 0.5μg/ml エチジウムブロマイドを含む泳動緩衝液 (40 mM Tris, 20mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA, pH 7.2) 中,

Table 1. Oligonucleotide primers and probe for PCR of human β-globin gene

Primer ^{a)}	Sequences (5'-3')
Hu β-1	AGAGCCATCTATTGCTTACA
Hu β-5	CTGTCTTGTAAACCTTGATAC
Hu β-3	GAAGTCTGCCGTTACTGCCC

a) The primer Hu β-1 is a sense primer. The primer Hu β-5 is an antisense primer. Hu β-3 was used as the probe to detect the amplified DNA fragment. The length of PCR product with Hu β-1 and Hu β-5 is 183 base pairs.

定電圧 100V において 2% アガロースゲル (宝酒造) により電気泳動を行った。泳動後、トランスファーを行った。すなわち、泳動終了後のゲルをアルカリ変性液 (0.5M 水酸化ナトリウム, 1.5M 塩化ナトリウム) 中で 30 分間振盪し、DNA を変性させた後中和液 (3M 塩化ナトリウム, 0.5M Tris-HCl, pH 7.2) 中で 15 分間振盪した。中和操作を 2 回繰り返した後、DNA は 20×SSC を用いてナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N) (Amersham) にトランスファーした。ナイロンメンブレンフィルターに 10 分間紫外線を照射して、DNA をフィルターに固定した。フィルターをハイブリダイゼーション緩衝液 (Amersham) 中で、42℃ の恒温水槽において 15 分のプレハイブリダイゼーションを行った後、0.05 (V/V)% ^{32}P 標識プローブを加え、2 時間のハイブリダイゼーションを 42℃ で行った。その後、フィルターを 2×SSC および 0.1% SDS を含む溶液中で 42℃、15 分の洗浄を 2 回行った。洗浄後、X 線フィルム (Kodak, New York, USA) を用いて室温下 1~2 時間の感光を行い、得られたオートラジオグラフィーにより解析を行った。さらに PCR 産物量の測定は、バイオイメージアナライザー (富士フィルム, 東京) を用いて、相補結合したプローブ DNA の放射活性を計測して行った。臓器あたりの転移腫瘍細胞数の算定は、以下の如く行った。すなわち、段階希釈した PC-3 細胞の DNA を用いて、各 PCR 反応ごとに検量線を作製し (図 1), 検量線に基づき $-\log_{10}\text{DNA} (\mu\text{g})$ から DNA (pg) を求め、以下の計算式により算出した²⁰⁾。

$$\text{組織あたりの転移腫瘍細胞数} = \frac{\text{組織あたりの DNA 総量} (\mu\text{g}) \times \text{組織 DNA } 1 \mu\text{g} \text{ あたりの PC-3 DNA 量 (pg}/\mu\text{g)}}{\text{細胞 1 個あたりの DNA 量 (6 pg/細胞)}}$$

IX. スラミンの治療実験

1. スラミンの PC-3 細胞に対する試験管内感受性試験

試験管内感受性試験には、Carmichael ら²²⁾の方法に従い、生細胞内の脱水素酵素の還元能を指標とするジメチルチアゾールジフェニルテトラゾリウムブロマイド [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 法を用いた。すなわち、180 μl の培養液中に細胞が 2×10^3 個になるように細胞浮遊液を作製し、これを 96 穴平底マイクロウエルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に 1 ウエル当たり 180 μl 分注した。同時にスラミン (和光純薬, 大阪) 希釈液を 20 μl 加え、 CO_2 濃度 5%, 37℃ の条件下で 3 日間培養した。スラミンは、最終濃度が 100, 200, 300, 400, 500 および 1,000 $\mu\text{g/ml}$ になるよう調製した。0.15M リン酸緩衝生理食塩水溶液に溶解した 2mg/ml の MTT 試薬 (Sigma) を 1 ウエル当たり 25 μl 加え、さらに 4 時間培養した。培養後培地を吸引し、ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) (和光純薬) 200 μl を加え、生成した MTT ホルマザン結晶を溶解した。各ウエルの 540nm における吸光度をイムノリーダー (日本インターメッド, 東京) を用いて測定した。効果判定 (増殖抑制率) は、対照群の吸光度を 100% とし、薬剤投与群の吸光度を比較することにより求めた。増殖抑制率の算出方法を次式に示す。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = (1 - \text{T/C}) \times 100$$

T は薬剤投与群の吸光度を示し、C は対照群の吸光度を示す。得られた結果は Student の t 検定により統計学的処理を行ない、危険率が 5% 以下である場合を有意とした。

2. 転移実験モデルを用いた肝および骨転移に対する治療実験

鶏卵胎児漿尿膜上の血管より PC-3 細胞を移植後 1 日目または 3 日目 (孵卵 11 日目または 13 日目) に、卵殻に新たに窓を開け、漿尿膜上の血管内よりスラミン希釈液 0.1ml を 50, 500 または 1,000 μg /卵投与した。薬剤投与量は Marutsuka らの投与量 (200 mg/kg)²³⁾を参考にし、鶏卵胎児の平均体重 (孵卵 13 日目, 約 5g)²⁴⁾に換算して決定した。移植後 7 日目すなわち孵卵 17 日目に摘出した肝と大腿骨より DNA を抽出し、PCR 法およびサザンブロット解析を行った。

3. 抗腫瘍効果の評価と判定法

転移巣治療実験における効果判定は非治療群の PCR 産物 (放射活性) を 100% とした場合の PCR 産物減少率を比較すること

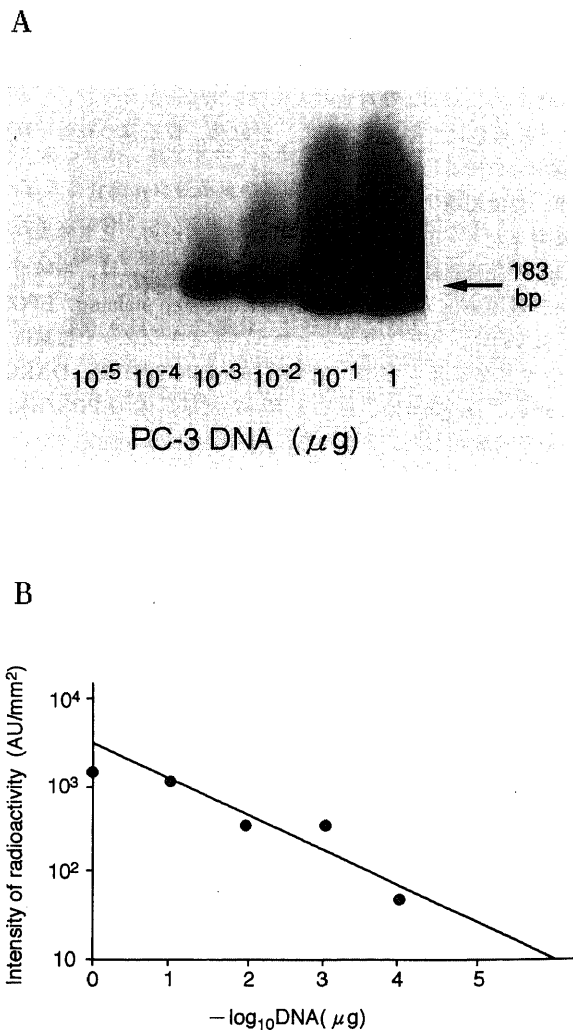


Fig. 1. PCR products from the genomic DNA of PC-3 cells. (A) Southern hybridization of PCR amplification products from serial dilutions of PC-3 genomic DNA. The PCR products amplified with the primers, Hu β -1 and Hu β -5, could be detected even at a concentration of $10^{-4} \mu\text{g}$ of PC-3 DNA. (B) Plot of the radioactivity of the PCR products obtained from the various dilutions of PC-3 DNA reacted against the PC-3 concentration. Radioactivity of the PCR products hybridized with the ^{32}P -labeled probe was analyzed with a Fujix Bioimage analyzer. Radioactivity is expressed in arbitrary units (AU) per mm^2 . ($r=0.883$)

によって行った。治療効果 (腫瘍増殖抑制率, %) は次式により求めた。

$$\text{治療効果 (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

Tは治療群の放射活性, Cは非治療群の放射活性とした。得られた結果は Student の t 検定により統計学的処理を行ない, 危険率が 5 % 以下である場合を有意とした。

成 績

I. PCR 法の感度

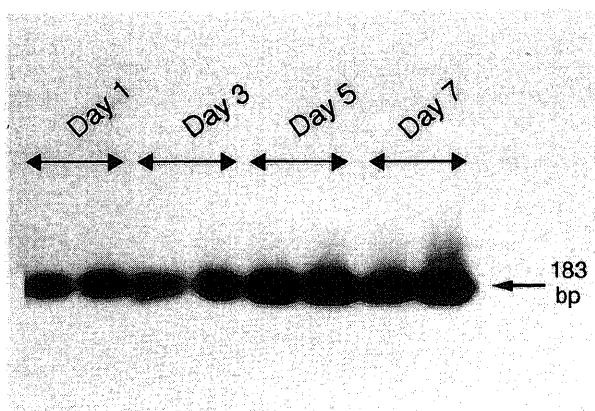
段階希釈した PC-3 細胞の DNA をテンプレートとして 28 サイクルの PCR 増幅反応を行った結果, 183塩基対の増幅 DNA 断片が単一バンドとして検出された。PCR-サザンブロット法の感度として, $10^{-4} \mu\text{g}$ までのヒト β -グロビン遺伝子の定量的検出が可能であった (図 1)。すなわち, 孵卵 17 日目の肝の平均重量, 500mg あたり約 2.5×10^4 個の転移腫瘍細胞が存在すれば検出可能であることが示された。また, 大腿骨については平均

重量 100mg あたり約 1.7×10^3 個の転移腫瘍細胞数が検出限界と推定された。なお, ヒト β -グロビン遺伝子に対する特異的増幅反応を正常の鶏卵胎児肝より抽出した DNA をテンプレートとして施行した場合, 非特異的増幅 DNA 断片は検出されなかった。

II. 鶏卵胎児肝および大腿骨における PC-3 細胞の経時的増殖動態

PC-3細胞を鶏卵漿尿膜上の血管内より 1×10^6 個移植し, 移植後 1, 3, 5 および 7 日目の肝または大腿骨より DNA を抽出し, PCR-サザンブロット法により解析した。肝および大腿骨のいずれの臓器の場合も移植後 1 日目から 7 日まで経時的に増幅 DNA 断片のバンドは増強しており (図 2), 被転移臓器で PC-3 細胞が増殖していることが確認された。細胞数に換算すると, 移植後 1 日目の肝においては, 約 3.5×10^5 個の PC-3 細胞の存在が推定され, 7 日目には約 9.1×10^6 個と増加していた。また大腿骨においては, 移植後 1 日目に約 2.4×10^2 個, 7 日目には約 9.9×10^3 個と増加していた (図 3)。なお, 予備試験において左右大腿骨間で転移細胞数には明らかな差は認められなかったことから, 本研究では左右いずれかの大腿骨を用いて解析を行うこととした。また, PC-3 細胞を移植したすべての胎児肝および大腿骨において, 増幅 DNA 断片が検出されたことか

A



B

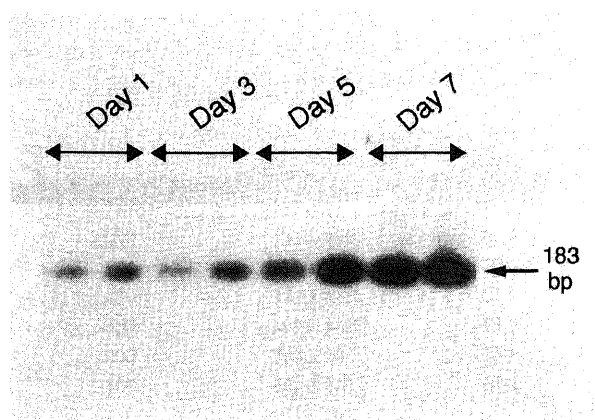


Fig. 2. Kinetics of growth of PC-3 cells in embryonic liver (A) and femoral bone (B) after injection into the chorioallantoic membrane vein of 10-day old chick embryos (1×10^6 cells/embryo). Two embryos were killed at the stated times (1, 3, 5, and 7 days) after tumor cell inoculation. Embryonic livers and femoral bones were dissected and weighed, and the DNA was extracted. One μg of each DNA was tested by the PCR technique and Southern hybridization.

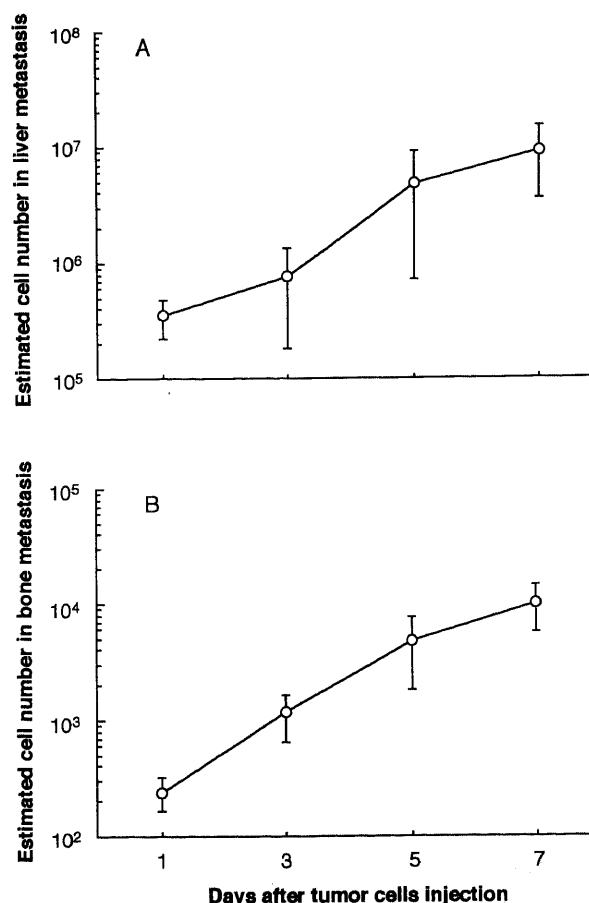


Fig. 3. Growth curve of metastasized PC-3 cells in embryonic liver (A) and femoral bone (B) after i. v. inoculation (1×10^6 cells/embryo). The values are expressed as mean \pm SD (n = 4).

ら、PC-3 細胞の生着率は100%と判定した。

Ⅲ. 病理組織学的所見

PC-3 細胞を移植した鶏卵胎児の肝および大腿骨を経時的に摘出し、移植細胞の転移動態を HE 染色にて組織学的に解析した。PC-3 細胞は移植後 2 時間経過した肝においては血管内に存在し、1 日目では血管外へ浸潤し、3 日目以降実質において分裂増殖像を示しつつ転移巣を形成していた (図 4-A, B, C, D)。一方、大腿骨では、移植後 7 日目に転移巣と思われる細胞塊が骨髓内に認められたが、鶏卵胎児の骨髓細胞との識別は困難であった (図 4-E)。そこで抗ヒトサイトケラチン抗体および抗ヒト Ki-67 抗原抗体による免疫組織化学染色を行った。その結果、抗ヒトサイトケラチン抗体により細胞質が、また抗ヒト Ki-67 抗原抗体により核が染色され、転移巣の存在が確認され

た (図 5-A, B)。さらに、骨膜内においてもこれらの抗体により微小転移巣の存在が示された (図 5-C)。なお、肝においても微小転移巣が両抗体で染色されることを確認した。

Ⅳ. スラミンの治療実験

1. スラミンの PC-3 細胞に対する試験管内感受性試験

PC-3 細胞のスラミンに対する薬剤感受性を MTT 法により調べた結果、PC-3 細胞に対してスラミンは濃度依存的殺細胞効果を示し、50% 増殖阻止濃度 (IC_{50} 値) は $250 \mu\text{g/ml}$ であった (表 2)。

2. 転移実験モデルを用いた肝および骨転移巣に対するスラミンの抑制効果の評価

PC-3 細胞を移植した鶏卵胎児に対して、移植後 1 および 3 日目にスラミンを、50, 500 または $1,000 \mu\text{g/卵}$ の投与量で各群

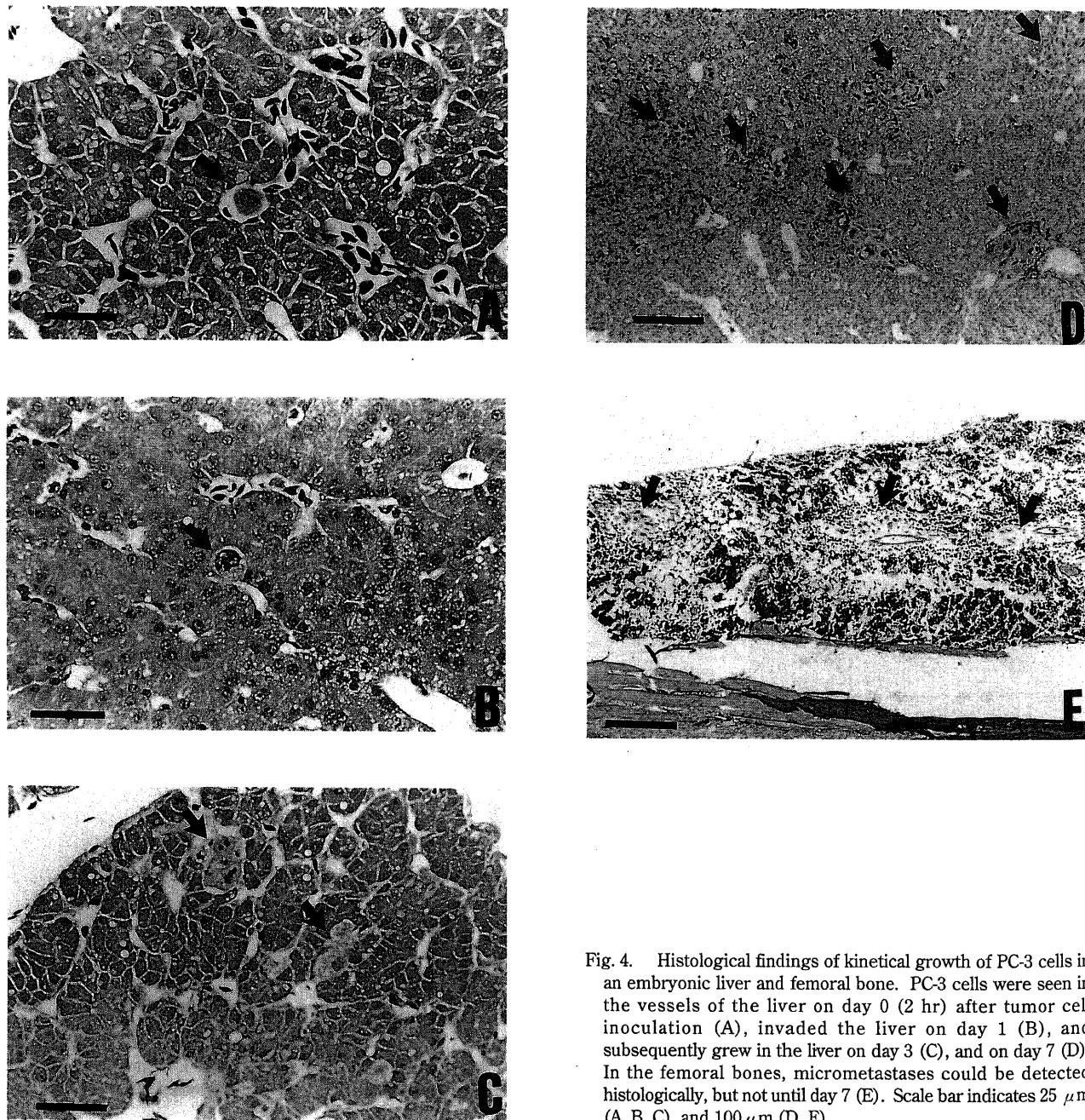


Fig. 4. Histological findings of kinetical growth of PC-3 cells in an embryonic liver and femoral bone. PC-3 cells were seen in the vessels of the liver on day 0 (2 hr) after tumor cell inoculation (A), invaded the liver on day 1 (B), and subsequently grew in the liver on day 3 (C), and on day 7 (D). In the femoral bones, micrometastases could be detected histologically, but not until day 7 (E). Scale bar indicates $25 \mu\text{m}$ (A, B, C), and $100 \mu\text{m}$ (D, E).

10個ずつ投与した。移植後1日目にスラミンを投与した鶏卵胎児における移植後7日目の生存率は、50 μg 投与群で8/10 (80%), 500または1,000 μg 投与群でそれぞれ5/10 (50%) および0/10 (0%) であり、500 μg 以上の投与で強い毒性を認めた。一方、移植後3日目にスラミンを投与した場合、50, 500または1,000 μg 投与群における生存率はそれぞれ10/10

(100%), 9/10 (90%) および5/10 (50%) であった。スラミンの抗腫瘍効果は、生存率が80%以上であった群について転移細胞の検出および定量をPCR-サザンブロット法により解析した結果をもとに評価した。PC-3細胞移植後1日目に50 μg 投与した場合、肝転移に対する抑制率は24.1%であった。また、移植後3日目に50または500 μg 投与した場合、スラミンの肝転

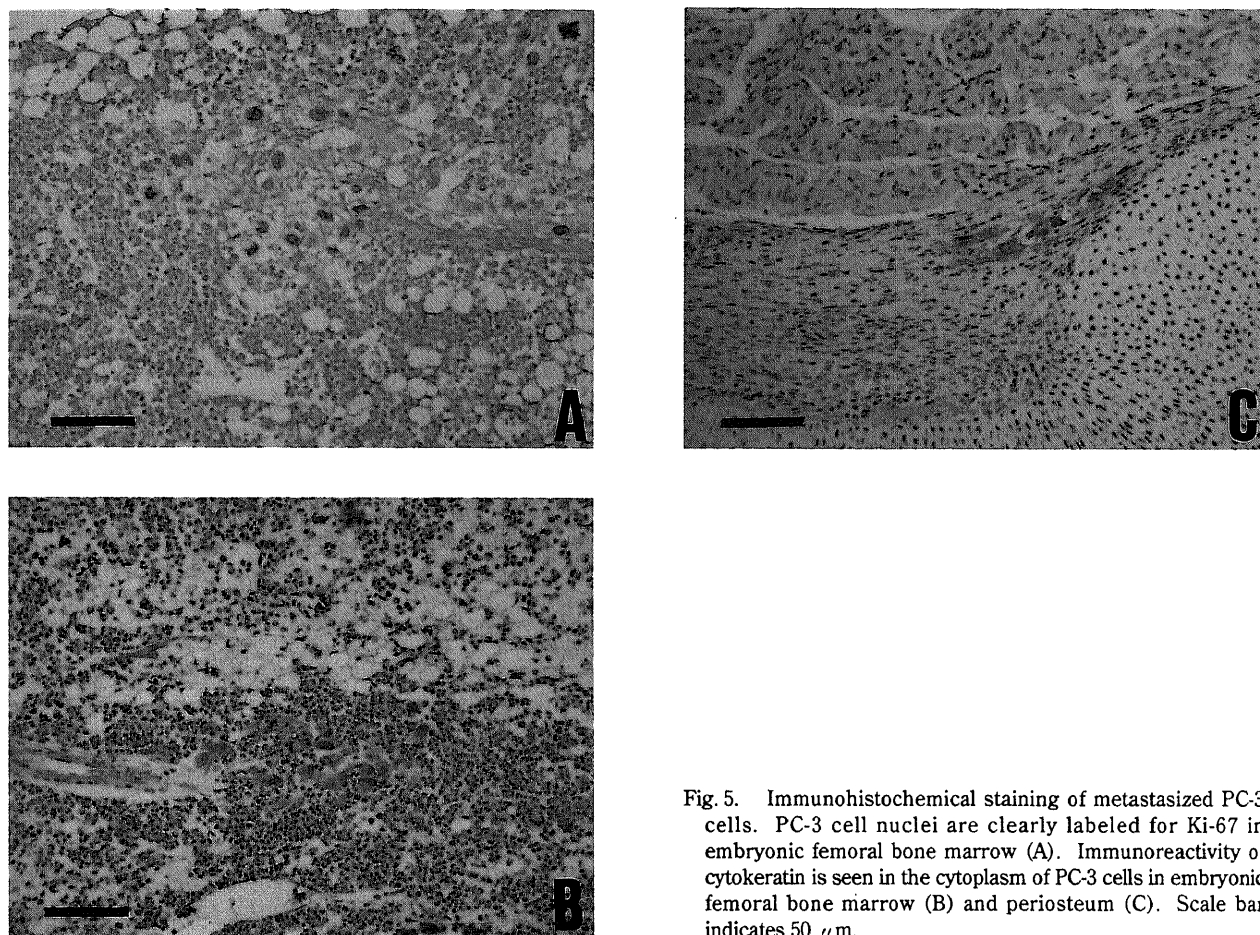


Fig. 5. Immunohistochemical staining of metastasized PC-3 cells. PC-3 cell nuclei are clearly labeled for Ki-67 in embryonic femoral bone marrow (A). Immunoreactivity of cytokeratin is seen in the cytoplasm of PC-3 cells in embryonic femoral bone marrow (B) and periosteum (C). Scale bar indicates 50 μm .

Table 2. In vitro cytotoxicity of suramin against PC-3 cells

Concentration of suramin ($\mu\text{g/ml}$)	OD ₅₄₀ ^{a)} ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	IR ^{b)} (%)
1,000	132 \pm 40 ^{c)}	86.7
500	274 \pm 31 ^{c)}	72.4
400	310 \pm 85 ^{c)}	68.7
300	409 \pm 108 ^{c)}	58.7
200	592 \pm 36 ^{c)}	40.3
100	842 \pm 85 ^{d)}	15.0
0	991 \pm 60	

a) PC-3 cells were incubated at the different concentrations of suramin for 72 hr at 37°C. Then, cell viability was estimated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, in which optical density at 540 nm (OD₅₄₀) was measured.

b) Inhibition ratio (IR) (%) = $[1 - (\text{OD}_{540} \text{ of treated group}) / (\text{OD}_{540} \text{ of control group})] \times 100$.

c) $P < 0.01$ vs. control group by Student's t-test.

d) $P < 0.05$ vs. control group by Student's t-test.

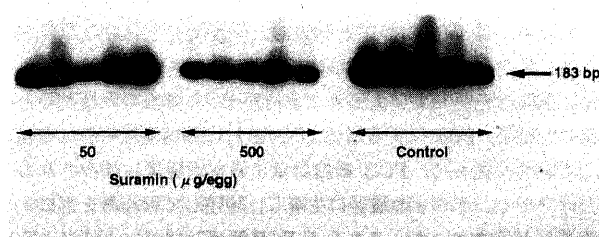


Fig. 6. Effect of suramin on liver metastasis of PC-3 cells in chick embryos. Suramin was intravenously injected 3 days after tumor cell inoculation. Embryonic livers were then dissected 7 days after tumor inoculation, and the DNA was extracted. One μg of each DNA was tested by the PCR technique and Southern hybridization.

Table 3. Inhibitory effect of suramin on liver metastasis of PC-3 cells in embryonic chick

Suramin dose (μ g/egg)	Day 1 ^{a)}			Day 3		
	Survival rate ^{b)}	Radioactivity ($\bar{x} \pm SD$, AU ^{c)} /mm ²)	IR ^{d)} (%)	Survival rate	Radioactivity ($\bar{x} \pm SD$, AU/mm ²)	IR (%)
50	8/10	635.5 \pm 134.3	24.1	10/10	394.4 \pm 118.4	16.2
500	5/10	NE ^{e)}	NE	9/10	185.3 \pm 56.5	60.6*
1,000	0/10	NE	NE	5/10	NE	NE
0	8/8	837.2 \pm 104.0		8/8	470.5 \pm 119.0	

a) Suramin was injected into the chorioallantoic membrane vein one day (Day 1) or three days (Day 3) after PC-3 cells (1×10^6) were inoculated in 10-day old chick embryos.

b) Number of living chick embryos 7 days after PC-3 cells inoculation/number of chick embryos in the group.

c) Arbitrary unit

d) Inhibition ratio = $[1 - (\text{Radioactivity of treated group}) / (\text{Radioactivity of control group})] \times 100$.

e) NE, not evaluated due to marked toxicity.

* $P < 0.05$ vs. control group by Student's t-test.

Table 4. Inhibitory effect of suramin on bone metastasis of PC-3 cells in embryonic chick

Suramin dose (μ g/egg)	Day 1 ^{a)}			Day 3		
	Survival rate ^{b)}	Radioactivity ($\bar{x} \pm SD$, AU ^{c)} /mm ²)	IR ^{d)} (%)	Survival rate	Radioactivity ($\bar{x} \pm SD$, AU/mm ²)	IR (%)
50	8/10	518.2 \pm 185.9	10.4	10/10	377.8 \pm 106.7	-13.4
500	5/10	NE ^{e)}	NE	9/10	311.1 \pm 54.4	6.7
1,000	0/10	NE	NE	5/10	NE	NE
0	8/8	578.3 \pm 232.6		8/8	333.3 \pm 92.0	

a) Suramin was injected into the chorioallantoic membrane vein one day (Day 1) or three days (Day 3) after PC-3 cells (1×10^6) were inoculated in 10-day old chick embryos.

b) Number of living chick embryos 7 days after PC-3 cells inoculation/number of chick embryos in the group.

c) Arbitrary unit

d) Inhibition ratio = $[1 - (\text{Radioactivity of treated group}) / (\text{Radioactivity of control group})] \times 100$.

e) NE, not evaluated due to marked toxicity.

移巢に対する増殖抑制効果は、16.2および60.6%であり、500 μ g投与した場合に統計学的に有意な抗腫瘍効果が認められた(表3, 図6)。一方、骨における転移抑制率は、1日目に50 μ g投与した場合、10.4%、また、3日目に50または500 μ g投与では-13.4および6.7%であり、明らかな抗腫瘍効果は認められなかった(表4)。

考 察

本研究では、Endoら¹⁹⁾が報告した受精鶏卵を用いる転移実験法に準じて、ヒト前立腺癌培養細胞PC-3の転移実験を試みた。鶏卵胎児肝および大腿骨におけるPC-3細胞の転移動態を調べた結果、PCRによる増幅DNA断片は移植後経時的に増強していた。従って、PC-3細胞は単に肝や大腿骨に捕捉されるだけでなく、それらの臓器に生着し、増殖して転移巣を形成することが示唆された。これらのPCR-サザンブロット法による結果は組織学的にも支持された。すなわち、肝においては転移細胞が経時的に増殖していることが示された。また、大腿骨においても移植後7日目で微小転移巣を確認し得た。腫瘍細胞の局在を確認する方法として抗ヒトサイトケラチン抗体あるいは抗Ki-67抗原抗体を用いた免疫組織化学染色法は、骨転移巣で

観察された如く、HE染色で形態的に識別困難であった微小転移巣の確認に非常に有用であった。ことに抗Ki-67抗原抗体は増殖細胞の存在を示すこと²⁵⁾より、組織内に検出された細胞が増殖能を有することの裏付けとして有用であり、PCR-サザンブロット法の結果を生物学的にも支持するものと思われた。前立腺癌の転移は、骨の発生頻度が最も高く、次いでリンパ節、肺および肝の順に多いと報告されている²⁶⁾²⁷⁾。また、骨転移の部位としては脊椎骨および骨盤骨に最も多い²⁷⁾。本転移モデルにおいて脊椎骨並びに骨盤骨について大腿骨と同様に転移巣の検出を行ったところ、いずれにおいてもPCRによる増幅DNA断片の検出が可能であった。しかし、脊椎骨や骨盤骨においては、筋組織や脊髄神経など骨以外の組織を取り除くことが非常に困難であるため、骨以外の組織の混入により、増幅DNA断片の放射活性の測定結果に変動が認められ、必ずしも骨転移のみを反映していない可能性が示唆された。一方、大腿骨においては骨膜から周囲組織の剥離は容易であり、左右いずれの大腿骨においても再現性に優れた骨転移巣の検出が可能であったことより、受精鶏卵法による骨転移の検討には、大腿骨を用いることが適当であると考えられた。これまでにヒト前立腺癌培養細胞の転移実験モデルとしては、PC-3細胞をヌードマウスの皮下、

前立腺または脾臓等に移植する方法が報告されている^{6) 8)}。これらの報告では、PC-3 細胞の転移はリンパ節、肺、または肝において認められているが、骨への転移は確認されていない。一方、Shevrin らはヌードマウスを用いて下大静脈をクリップにて閉塞させ生理的血液循環を変えることで尾静脈より投与した PC-3 細胞が腰椎に骨転移を形成したと報告した⁹⁾。また、Wang らは転移能の高い PC-3 細胞のみを選択的に SCID マウスの尾静脈より投与することで骨転移の形成を確認したと報告している⁹⁾。しかし、これらヌードマウスあるいは SCID マウスを用いる実験は特別な動物実験施設を必要とすること、実験手技に熟練を要すること、またマウス自体が高価であるために多額の実験費用を要することなどの問題がある。さらに骨転移の形成率も 10~50% と低率であり^{9,10)}、その再現性に問題を残している。受精鶏卵法を応用した本モデルではこれまで形成が困難とされてきたヒト前立腺癌細胞の骨転移を 100% の生着率をもって再現することが可能であった。この高い転移形成率は、鶏卵胎児における血液循環の特殊性に負うところが大きいと思われる。すなわち、漿尿膜上の静脈内に投与された腫瘍細胞は、臍静脈、下大静脈を経て右心房に入り、心房中隔の穴を通るか、あるいは、右心室、肺動脈、左右動脈管を通り、背側大動脈へ至る。さらに背側大動脈から臍動脈を経て、そこから分岐する坐骨動脈より大腿骨に至る²⁹⁾。従って、静脈内に投与された腫瘍細胞は肺を経由することなく大循環に入ることになり、骨への腫瘍細胞の到達効率が高まるものと考えられた。さらに、本モデルは、その高い転移形成率に加え転移細胞の定量性にも優れているので、治療実験モデルとして応用価値が高いと考えられた。

今日、進行性前立腺癌の治療として一般的にホルモン療法が施行されている。しかしそれらの大部分の症例は数年の経過の後にホルモン抵抗性を獲得し、これらの症例においては有効な抗癌剤も見当たらないことから、治療に難渋しているのが現状である。このようなホルモン不応性前立腺癌に対する新しい抗癌剤のひとつとして、スラミンが注目されている。1987 年より米国国立癌研究所 (National Cancer Institute) を中心として、ホルモン抵抗性前立腺癌に対するスラミンの臨床試験が行われ、その有用性が最近報告されている^{16) 18)}。スラミンはトリパノソーマ症に対する抗寄生虫薬として開発され、トリパブルーに類似の構造をもつ薬剤である。スラミンには試験管内で、PC-3 細胞を含め種々の腫瘍細胞株に対する抗腫瘍効果があることが示されてきた^{29) 30)}。その作用機序については、未だ不明な部分もあるが多様な生物活性をもっていることが明らかになってきている。すなわち、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)³⁴⁾、上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF)^{32,35)}、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF)^{29,35)}、形質転換増殖因子アルファ (transforming growth factor-alpha, TGF- α)³¹⁾、インスリン様増殖因子 I (insulin-like growth factor-I, IGF-I)³⁶⁾ など各種増殖因子作用の阻害や、G 結合蛋白³⁷⁾、プロテインキナーゼ C³⁸⁾、DNA ポリメラーゼ³⁹⁾ さらに DNA トポイソメラーゼ II⁴⁰⁾ など様々な酵素活性の抑制が報告されている。本研究では、スラミンの投与時期を変えることにより、転移の初期段階および転移巣形成後の二つの面からスラミンの抗腫瘍活性を検討した。その結果、PC-3 細胞の移植後 1 日目にスラミンを投与した場合、500 または 1,000 μ g 投与群において強い毒性を認め、転移抑制効果を評価することは

できなかった。また、毒性を認めなかった投与量では、肝および骨いずれも転移抑制効果が認められなかった。移植後 3 日目にスラミンを 500 μ g 投与した場合、肝転移の増殖抑制率は 60.6% と、抗腫瘍効果がみられた。PC-3 細胞が微小転移巣をすでに形成している移植後 3 日目の段階では、前述した各種の増殖因子作用の阻害^{29,31,34)~36)} や酵素活性の抑制^{37)~40)} などスラミンの様々な生物学的作用により抗腫瘍効果を示したものと考えた。一方、骨転移巣に対する抗腫瘍効果は認められず、被転移臓器の環境によってスラミンの効果に差が認められた。Walther らは生後 3 日から 6 日目のマウスの頭蓋冠を用いた実験で、放射線核種で標識したスラミンの骨組織内分布を調べたところ、スラミンは骨基質の表面に主に分布しており、骨髓内の分布は疎であったと報告⁴¹⁾ しており、スラミンの分布の偏りで骨髓内の PC-3 細胞に十分量のスラミンが到達しなかった可能性が考えられた。また、Donat らは骨基質には増殖因子であるトランスフェリンが多く存在し、そのトランスフェリンによりスラミンの PC-3 細胞に対する成長阻止作用が抑制されることを報告している⁴²⁾。従って、ホルモン非依存性前立腺癌の転移巣に対するスラミンの作用については、スラミンの組織内分布ならびにスラミンの作用に対して拮抗的に働く生体因子について更なる検討が必要であると思われる。

以上の結果より、受精鶏卵法は再現性の高いヒト前立腺癌の転移実験モデルとして、転移・浸潤の機序解明および転移抑制剤開発の基礎的研究に有用な実験系になりうるものと考えられた。

結 論

受精鶏卵法を用いて、ヒト前立腺癌細胞の転移実験モデルの確立を試み、さらにその応用として肝および大腿骨転移巣に対するスラミンの抗腫瘍効果の検討を行ない、以下の結果を得た。

1. ヒトに特異的な β -グロビン遺伝子配列を PCR-サザンブロット法を用いて増幅することにより鶏卵胎児組織における転移細胞の検出を行った。ヒト前立腺癌培養株 PC-3 細胞を鶏卵 10 日目の鶏卵漿尿膜上の血管内に移植した鶏卵胎児肝および大腿骨において経時的に増幅 DNA 断片の増強が認められた。すなわち、PC-3 細胞が、肝や大腿骨に転移増殖していることが示された。

2. 組織学的には、肝においては腫瘍細胞の同定は容易であり、経時的に腫瘍細胞が浸潤、増殖する像が観察された。一方、大腿骨においては形態学的に腫瘍細胞の同定は困難であったが、抗ヒトサイトケラチン抗体および抗ヒト Ki-67 抗原抗体を用いた免疫組織化学染色により、微小転移巣の存在が移植後 7 日目に初めて確認された。従って、微小転移巣の検出には、PCR-サザンブロット法が感度および定量性において組織学的検索法に比べ優れていた。

3. PC-3 細胞移植後 1 日目にスラミンを 50 μ g/卵投与した場合、肝および骨転移形成に対する抑制効果は認められなかった。一方、移植後 3 日目にスラミンを 500 μ g/卵投与した場合の肝および骨の転移巣に対する増殖抑制率はそれぞれ 60.6 および 6.7% であり、スラミンの抗腫瘍効果は被転移臓器における環境要因によって影響されることが示唆された。

4. 本法は、再現性の高いヒト前立腺癌細胞の骨および肝への微小転移巣形成モデルとして、ヒト前立腺癌の転移・浸潤機

構の解明および転移巣に対する新しい治療法の開発に有用な実験系になりうるものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師並木幹夫教授に深甚なる謝意を表します。また、多大なる御協力と御鞭撻を賜りました金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に衷心より謝意を表します。また、本研究遂行にあたり、終始御助言、御協力頂きました打林忠雄助教授、越田 潔講師、國見一人助手ならびに金沢大学がん研究所化学療法部遠藤良夫博士に心より感謝いたします。さらに、多大なる御協力を賜りました金沢大学医学部泌尿器科学講座諸兄、ならびに金沢大学がん研究所化学療法部の皆様に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の一部は、第83回日本泌尿器科学会総会(1995年、千葉)において発表した。

文 献

- 1) 大野良之, 若井建志. 前立腺癌の疫学. 前立腺癌診療マニュアル(前立腺研究財団編), 第1版, 112-139頁, 金原出版, 東京, 1995
- 2) 阿曾佳郎, 神林知幸, 田島 惇, 鈴木和雄, 大田原佳久, 大見嘉郎, 太田信隆, 畑 昌宏, 牛山知己, 増田宏昭, 鈴木俊秀, 北川元昭, 中原正男, 鈴木明彦, 塚田 隆, 中野 優. 前立腺癌220症例の治療成績. 日泌尿会誌 80: 1316-1320, 1989
- 3) 今井強一, 山中英寿. 前立腺癌のスクリーニング検査. 特に早期癌発見のために. 日泌尿会誌 84: 1175-1187, 1993
- 4) Deguchi T, Doi T, Ehara H, Ito S, Takahashi Y, Nishino Y, Fujihira S, Kawamura T, Komeda H, Horie M, Kaji H, Shimokawa K, Tanaka T, Kawada Y. Detection of micrometastasis prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 53: 5350-5354, 1993
- 5) Shevrin DH, Kukreja SC, Ghosh L, Lad TE. Development of skeletal metastasis by human prostate cancer in athymic nude mice. *Clin Expl Metastasis* 6: 401-409, 1988
- 6) Shevrin DH, Gorny KI, Kukreja SC. Patterns of metastasis by the human prostate cancer cell line PC-3 in athymic nude mice. *Prostate* 15: 187-194, 1989
- 7) Stephenson RA, Dinney CPN, Gohji K, Ordonez NG, Killion JJ, Fidler IJ. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J Nat Cancer Inst* 84: 951-957, 1992
- 8) Waters DJ, Janovitz EB, Chan TCK. Spontaneous metastasis of PC-3 cells in athymic mice after implantation in orthotopic or ectopic microenvironments. *Prostate* 26: 227-234, 1995
- 9) Wang M, Stearns ME. Isolation and characterization of PC-3 human prostatic tumor sublines which preferentially metastasize to select organs in S.C.I.D. mice. *Differentiation* 48: 115-125, 1991
- 10) Murphy JB. Transplantability of malignant tumors to the embryos of a foreign species. *J Am Med Assoc* 59: 874-875, 1912
- 11) Ossowski L, Reich E. Experimental model for quantitative study of metastasis. *Cancer Res* 40: 2300-2309, 1980
- 12) Chambers AF, Skafir R, Ling V. A model system for studying metastasis using the embryonic chick. *Cancer Res* 42: 4018-4025, 1982

- 13) Dexter DL, Lee ES, DeFusco DJ, Libbey NP, Spremulli EN, Calabresi P. Selection of metastatic variants from heterogeneous tumor cell lines using the chicken chorioallantoic membrane and nude mouse. *Cancer Res* 43: 1733-1740, 1983
- 14) Uchida H, Sasaki T, Tanaka M, Endo Y, Nitta K, Nishikawa K, Chuman H, Fukuma H, Matsumoto K. Response to antitumor agents of murine transplantable tumors onto chorioallantoic membrane of chick embryo. *Jpn J Cancer Res* 78: 729-736, 1987
- 15) Endo Y, Sasaki T, Harada F, Noguchi M. Specific detection of metastasized human tumor cells in embryonic chicks by the polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 81: 723-726, 1990
- 16) Myers C, Cooper M, Stein C, LaRocca R, Walther MM, Weiss G, Choyke P, Dawson N, Steinberg S, Uhrich MM, Cassidy J, Kohler DR, Trepel J, Linehan WM. Suramin: a novel growth factor antagonist with activity in hormone-refractory metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 10: 881-889, 1992
- 17) Eisenberger MA, Sinibaldi VJ, Reyno LM, Sridhara RR, Jodrell SD, Zuhowski EG, Tkaczuk KH, Lowitt MH, Hemady RK, Jacobs SC, VanECHO D, Egorin MJ. Phase I and clinical evaluation of a pharmacologically guided regimen of suramin in patients with hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 13: 2174-2186, 1995
- 18) Rosen PJ, Mendoza EF, Landaw EM, Mondino B, Graves MC, McBride JH, Turcillo P, deKernion J, Beldegrun A. Suramin in hormone-refractory metastatic prostate cancer: a drug with limited efficacy. *J Clin Oncol* 14: 1626-1636, 1996
- 19) Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17: 16-23, 1979
- 20) Tsutsumi Y, Serizawa A, Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen: application to intra-operative frozen diagnosis. *Pathol Int* 45: 108-115, 1995
- 21) 太田安彦. 特異的 DNA 増幅反応法を用いたヌードマウスにおけるヒト転移腫瘍細胞の定量的検出. 十全医会誌 101: 10-25, 1992
- 22) Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942, 1987
- 23) Marutsuka K, Hasui Y, Asada Y, Naito S, Osada Y, Sumiyoshi A. Effects of suramin on metastatic ability, proliferation, and production of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 2 in human renal cell carcinoma cell line SN12C-PM6. *Clin Exp Metastasis* 13: 116-122, 1995
- 24) 野口美香, 遠藤良夫, 佐々木琢磨. 受精鶏卵を用いる転移実験法. がんの浸潤・転移研究マニュアル(がん転移研究会編), 第1版, 62-71頁, 金芳堂, 京都, 1994
- 25) Gerdes D, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715, 1984
- 26) Saitoh H, Hida M, Shimbo T, Nakamura K, Yamagata J,

Satoh T. Metastatic patterns of prostatic cancer. *Cancer* 54: 3078-3084, 1984

27) 中田誠司, 今井強一, 内田達也, 山中英寿, 橋本勝善, 小倉治之, 中野勝也, 栗田 誠, 斉藤佳隆, 小野芳啓, 久保田裕. 群馬県およびその近郊における前立腺癌患者の臨床統計的観察. 泌尿紀要 37: 1261-1270, 1991

28) Lillie FR. *The Development of the Chick*, 2nd ed, p348-377, Henry Holt and Company, New York, 1927

29) Larocca RV, Danesi R, Cooper MR, Jamis-Dow CA, Ewing MW, Linehan WM, Myers CH. Effect of suramin on human prostate cancer cells in vitro. *J Urol* 145: 393-398, 1991

30) Myers RB, Parker M, Grizzle WE. The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 120 (Suppl): 11-13, 1994

31) Kim JH, Sherwood ER, Sutkowski DM, Lee C, Kozlowski JM. Inhibition of prostatic tumor cell proliferation by suramin: alterations in TGF alpha-mediated autocrine growth regulation and cell cycle distribution. *J Urol* 146: 171-176, 1991

32) Vignon F, Prebois C, Rochefort H. Inhibition of breast cancer growth by suramin. *J Natl Cancer Inst* 84: 38-42, 1992

33) Fantini J, Rognoni JB, Roccabianca M, Pommier G, Marvaldi J. Suramin inhibits cell growth and glycolytic activity and triggers differentiation of human colic adenocarcinoma cell clone HT29-D4. *J Biol Chem* 264: 10282-10286, 1989

34) Hosang M. Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity. *J Cell Biochem* 29: 265-273, 1985

35) Coffey RJ, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in

AKB-2B cells. *J Cell Physiol Metab* 132: 143-148, 1984

36) Pollak M, Richard M. Suramin blockade of insulin-like growth factor I-stimulated proliferation of human osteosarcoma cells. *J Natl Cancer Inst* 82: 1349-1352, 1990

37) Butler SJ, Kelly EC, McKenzie FR, Guild SB, Wakelam MJ, Milligan G. Differential effects of suramin on the coupling of receptors to individual species of pertussis-toxin-sensitive guanine-nucleotide-binding proteins. *Biochem J* 251: 201-205, 1988

38) Hensley CE, Boscoboinik D, Azzi A. Suramin, an anti-cancer drug, inhibits protein kinase C and induces differentiation in neuroblastoma cell clone NB2A. *FEBS Lett* 258: 156-158, 1989

39) Spiegelman Z, Dowers A, Kennedy S, DiSorbo D, O'Brien M, Barr R, McCaffrey R. Antiproliferative effects of suramin on lymphoid cells. *Cancer Res* 47: 4694-4698, 1987

40) Bojanowski K, Lelievre S, Markovits J, Couprie J, Jacquemin SA, Larsen AK. Suramin is an inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3025-3029, 1992

41) Walther MM, Kragel PJ, Trahan E, Venzon D, Blair HC, Schlesinger PH, Jamai-Dow C, Ewing MW, Myers CE, Linehan WM. Suramin inhibits bone resorption and reduces osteoblast number in a neonatal mouse calvarial bone resorption assay. *Endocrinology* 131: 2263-1170, 1992

42) Donat SM, Powell CT, Israeli RS, Fair WR, Ileson WDW. Reversal by transferrin of growth-inhibitory effect of suramin on hormone-refractory human prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 87: 41-46, 1995

Usefulness of Chick Embryo Assay System as Metastatic Model for Human Prostate Cancer Tadahiro Kobayashi, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **105**, 796—806 (1996)

Key words prostate cancer, metastasis, chick embryo, PC-3, suramin

Abstract

To elucidate the mechanism of metastasis of prostate cancer, we developed an experimental model of metastasis of human prostate cancer using the chick embryo system. The androgen-independent prostate cancer cell line, PC-3 (1×10^6 cells/egg) was inoculated into the chorioallantoic membrane (CAM) vein of 10-day chick embryos. At different points after tumor cells inoculation, the embryos were sacrificed and their livers and femoral bones were removed. Using the DNA extracted from each organ as a template, PCR amplification of the human β -globin gene and analysis of amplified DNA fragments by the Southern hybridization were performed (PCR-Southern hybridization). In this experimental model, the rate of formation of liver and bone metastasis was 100%. The number of metastatic tumor cells per organ of chick embryo increased with time. Seven days after inoculation, it was about 9.1×10^6 cells in the liver and about 9.9×10^3 cells in the femoral bone. The PC-3 cells invaded the tissue one day after inoculation, and then the cells underwent division and proliferation in the hepatic parenchyma, eventually leading to the formation of a micrometastatic focus 3 days after inoculation. In the femoral bone, a metastatic focus was detected in the bone marrow 7 days after inoculation. An immunohistochemical examination using antibodies to human cytokeratin and to human Ki-67 antigen provided confirmation of micrometastasis. Then we examined the inhibitory effect of suramin on the liver and bone metastasis of PC-3 cells using this experimental system. Suramin was injected into the CAM vein one day or three days after tumor cell inoculation. Seven days after inoculation, the liver and the femoral bone were dissected and tested for metastatic tumor cells by the PCR-Southern hybridization. When suramin was injected one day after inoculation at a dosage of $50 \mu\text{g/egg}$, the metastasis inhibitory ratio was 24.1% in the liver and 10.4% in the bone. When suramin was administered 3 days after tumor cell inoculation at a dosage of $500 \mu\text{g/egg}$, it inhibited tumor growth in the liver (60.6%) but not in the bone (6.7%). From the above results, the chick embryo system seems to provide a highly reproducible model of metastasis in human prostate cancer which will help to clarify the mechanism of the metastasis or invasion of human prostate cancer, and to carry out basic research for the development of drugs inhibiting metastasis of prostate cancer.